



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 322 880**

⑫ Número de solicitud: 200502386

⑮ Int. Cl.:
H01M 4/88 (2006.01)
H01M 8/16 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **30.09.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2009**

Fecha de la concesión: **12.04.2010**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **23.04.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.04.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑰ Inventor/es: **Fernández López, Víctor Manuel;
López de Lacey, Antonio y
Rüdiger Ortiz, Olaf**

⑰ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑰ Título: **Electrodo biológico con la enzima hidrogenasa, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.**

⑰ Resumen:

Electrodo biológico con la enzima hidrogenasa, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

En la presente invención se protegen electrodos biológicos modificados con enzimas hidrogenasas (ánodos) mediante los cuales es posible obtener energía eléctrica del hidrógeno en una configuración típica de pilas de combustible; asimismo, con estos electrodos modificados con hidrogenasa (cátodos) es posible producir hidrógeno a partir de agua en una configuración típica de célula electroquímica. Igualmente se describe los procedimientos de fabricación y sus aplicaciones.

ES 2 322 880 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Electrodo biológico con la enzima hidrogenasa, procedimiento de obtención y sus aplicaciones.

5 Sector de la técnica

La presente invención se relaciona con electrodos biológicos para pilas de combustible de hidrógeno como alternativa a otros catalizadores de oxidación de hidrógeno tales como platino y otros metales, y también para la generación de hidrógeno en celdas electrolíticas. Por tanto, se relaciona con la biotecnología, ingeniería genética y más concretamente con el uso de enzimas como biocatalizadores y más en particular como biocatalizadores redox y más en particular con la biotecnología de la producción y utilización de hidrógeno.

Estado de la técnica

Un debate de acuciante actualidad gira en torno al tipo de combustible que se usará en el futuro para sostener la actividad humana, que ha pasado de utilizar sucesivamente y de modo mayoritario la madera, el carbón y luego el petróleo y el gas natural, en un lapso de tiempo relativamente corto. En la actualidad la tendencia es a diversificar las fuentes, con una progresiva utilización del metano, y con la mente puesta en las energías renovables, entre las que el hidrógeno obtenido a partir del agua es considerado por algunos como una fuente "inagotable" de energía, bien que al día de hoy el petróleo sigue siendo la materia prima a partir de la que se obtiene el hidrógeno que consumimos. Junto a la naturaleza del combustible a emplear, se debate el modo más conveniente para su utilización; a este respecto, interesa destacar que en cualquier escenario que se considere, e independientemente del combustible utilizado, se hace una apuesta clara por la implantación de las Pilas de Combustible como uno de los medios más seguro, limpio y eficaz de convertir la energía contenida en esos combustibles en electricidad (M.S. Dreseslhaus and I.L. Thomas, *Alternative energy technologies*. Nature, 414, 332-337 (2001)). En este contexto cabe resaltar el hecho de que en los últimos años se ha asistido a una intensa investigación en Biopilas de Combustible llamadas así porque en los electrodos de la pila interviene elementos biológicos, enzimas redox o células microbianas en ánodos y en cátodos (G. Tayhas, R. Palmore, and G.M. Whitesides, *Microbial and Enzymatic Biofuel Cells* in Enzymatic conversion of biomass for fuel production, M.E. Himmel, J.O. Baker and R.P. Overend, eds., American Chemical Society Symposium series, n° 566, ACS, Washington, DC., 271-290, 1994). En una reciente revisión, A. Heller da cuenta del estado de la investigación en el campo de las biopilas de combustible enzimáticas, en las que son mayoría las que utilizan como combustible glucosa y oxígeno. Generalmente se basan en un diseño en el que se conectan electrodos modificados con los enzimas glucosa oxidasa y lacasa en los que, respectivamente, se oxida la glucosa en el ánodo, con la concomitante reducción del oxígeno hasta agua en el cátodo. Hay que tener en cuenta que en estas biopilas de combustible se suelen utilizar mediadores redox (en disolución o en forma de polímeros redox) para transportar electrones entre los centros activos de los respectivos enzimas y los electrodos (A. Heller, *Miniature biofuel cells*, Phys. Chem. Chem. Phys., 6, 209-216, 2004).

La primera biopila de combustible que utiliza hidrógeno y oxígeno descrita por S. Tsujimura (S. Tsujimura, M. Fujita, H. Tatsumi, K. Kano, T. Ikeda, *Bioelectrocatalysis-based dihydrogen/dioxygen fuel cell operating at physiological pH*, Phys. Chem. Chem. Phys., 3, 1331-1335, 2001) utiliza células bacterianas de *Desulfovibrio vulgaris* como catalizador de consumo de hidrógeno en el ánodo; además añade el compuesto metil viológeno como mediador redox entre las bacterias y el electrodo.

Más recientemente se ha publicado una patente (United States Patent Application 20040214053, A1, October 28, 2004, Foreign Application data: Aug 24, 2001, GB, n° 0120698.6) sobre una biopila de combustible biológica, que emplea hidrógeno como combustible, en el que el ánodo está recubierto con la hidrogenasa de tipo Ni-Fe purificada a partir de extractos de la bacteria *Allochromatium vinosum*. Muy importante, en relación con nuestra patente, es que en esta invención el enzima se deposita por adsorción en presencia de polímeros catiónicos sobre el electrodo de carbón lo que da lugar a electrodos funcionales pero fueron poco estables. Previamente se habían publicado artículos científicos en los que enzimas hidrogenasa de distintos microorganismos se han depositado sobre electrodos mediante diferentes tipos de uniones no covalentes:

(a) Por adsorción en carbón vítreo (glassy carbon), con ó sin adiciones de sulfato de polimixina B (Butt, J. N.; Filipiak, M.; Hagen, W. R. Direct Electrobiochemistry of *Megasphaera elsdenii* iron hydrogenase: Definition of the enzyme's catalytic operating potential and quantitation of the catalytic behaviour over a continuous potential range. *Eur. J. Biochem.* 245, 116-122, 1997). En este documento se obtienen corrientes eléctricas en atmósfera de hidrógeno, pero las corrientes no son persistentes lo que atribuyen bien a pérdida de proteína o a una orientación no favorable de los centros redox del enzima respecto a la superficie del electrodo;

(b) por adsorción en grafito pirolítico "edge" con adición de sulfato de polimixina B, (Pershad, H.R., Duff, J.L.D., Heering, H. A., Duin, E. C., Albracht, S.P.J., Armstrong, F.A. Catalytic electron transport in *Allochromatium vinosum* [Ni-Fe]-hydrogenase: Application of voltametry in detecting redox-active centres and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H^+/H_2 value *Biochemistry*, 38, 8992-8999, 1999). Estos autores demuestran que la hidrogenasa de Ni-Fe que estudian, que es muy similar a la utilizada en la presente invención, es extremadamente activa, aun cuando no saben si tiene más de una capa de enzima y no saben la orientación, a diferencia de nosotros que por nuestro método se obtiene una sola monocapa y con las moléculas en la orientación favorable para el intercambio de corriente con el electrodo.

(c) Enzyme electrokinetics: Hydrogen evolution and oxidation by *Allochrochromatium vinosum* [Ni-Fe]-hydrogenase. Leger, C.; Jones, A. K.; Roseboom, W.; Albracht, S. P. J.; Armstrong, F. A. *Biochemistry*. 41, 15736-15746, 2002. En este documento se usa el mismo electrodo que en el trabajo anterior, grafito pirolítico “edge” por adsorción.

5 (d) Direct and electrically wired bioelectrocatalysis by hydrogen from *Thiocapsa roseopersicina*. Morozov, S. V.; Karyakina, E. E.; Zorin, N. A.; Varfolomeyev, S. D.; Cosnier, S.; Karyakin, A. A. *Bioelectrochemistry* 55, 169-171, 2002. Aquí se emplea carbón vítreo y filamentos de carbón, por adsorción física.

10 (e) Inhibition and aerobic kinetics of *Desulfovibrio fructosovorans* NiFe hydrogenase studied by protein film voltammetry. Leger, C.; Dementin, S.; Bertrand, P.; Rousset, M.; Guigliarelli, B. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 12162-12172, 2004. Aquí se emplean grafito pirolítico “edge” por adsorción física.

15 (f) Hydrogenases from the hyperthermophilic bacterium *Aquilex aeolicus*: electrocatalysis of the hydrogen production/consumption reactions at carbon electrodes. Lojou, E.; Giudici-Orticoni, M. T.; Bianco, P. *J. Electroanal. Chem.*, 577, 79-86, 2005. Se realiza sobre grafito y con enzimas hipertermofílicas, no estudian la estabilidad, pero no hay unión covalente.

20 (g) Design and characterization of redox enzyme electrodes: new perspectives on established techniques with application to an extremophile hydrogenase. Johnston, W.; Cooney, M. J.; Liaw, B. Y.; Sapra, R.; Adams, M. W. *Enzyme Microb. Technol.*, 36, 540-549, 2005. Estos autores depositan un enzima hipertermofílico sobre papel de carbón pirolítico poroso y sobre grafito empaquetado en columna, también por adsorción directa. En todos los casos en que han estudiado la estabilidad de los electrodos las respuestas electrocatalíticas no fueron persistentes y los autores han atribuido esta disminución de la actividad catalítica de los electrodos a la pérdida de enzima hidrogenasa de la superficie del electrodo donde se mantenía a través de interacciones débiles, principalmente de tipo electrostático, o a desplazamiento de la hidrogenasa adsorbida por otras especies de la disolución.

En resumen, en otros trabajos no existen estudios de estabilidad de la enzima y en ninguno de los trabajos publicados, hay inmovilización de enzima hidrogenasa por unión covalente tal como se describe en esta patente por primera vez.

Descripción

Descripción breve

35 Un objeto de la presente invención lo constituye un electrodo biológico, en adelante electrodo biológico de la presente invención, basado en la utilización de una enzima tipo hidrogenasa, de Ni-Fe o de tipo “sólo Fe”, como catalizador de oxidación de hidrógeno, unida covalente a un electrodo de un material conductor de electricidad a través de, respectivamente, residuos carboxílicos ó residuos amino expuestos en su superficie ó introducidos mediante procedimientos químicos adecuados en la superficie de dichos electrodos.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el electrodo biológico de la presente invención utilizado como catalizador electroquímico de producción de hidrógeno.

45 Otro objeto particular de la invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que la enzima hidrogenasa contiene motivos de afinidad localizados en lugares específicos de su superficie que permiten su inmovilización orientada sobre el electrodo conductor. Por ejemplo, determinados complejos metálicos poseen afinidad por agrupamientos de histidinas que pueden introducirse mediante técnicas de ingeniería genética en la hidrogenasa.

50 Así, un objeto particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que el material de electrodo conductor utilizado es un material metálico, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: oro, cobre, plata o platino.

55 Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que el material de electrodo utilizado es un material carbonáceo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: carbón vítreo, carbón pirolítico “basal”, carbón pirolítico borde (“edge”), hilo de carbón y tela de carbón.

60 Una realización particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que la enzima tipo hidrogenasa es aislada de la bacteria *Desulfovibrio gigas* E.C.1.18.89.1 (la secuencia de aa del enzima utilizada tiene el código PDB 1H2A de referencia en la base de datos Protein Data Bank) y el electrodo es oro (ver ejemplo 1).

65 Otra realización particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que la enzima tipo hidrogenasa es aislada de la bacteria *Desulfovibrio gigas* E.C.1.18.89.1 (la secuencia de aa del enzima utilizada tiene el código PDB 1H2A de referencia en la base de datos Protein Data Bank) y el electrodo es de carbón pirolítico “edge” (ver ejemplo 2).

Otra realización particular de la invención contempla el electrodo biológico de la invención está constituido por un electrodo de material carbonáceo modificado con grupos carboxilos que se modifica además con N,N-bis(carboxymetil)-L-lisina que forman complejos del tipo nitrilotriacético con iones Ni, Cu ó Co (estos complejos metálicos poseen afinidad por agrupamientos de histidinas) y una enzima hidrogenasa modificada o mutada que comprende un motivo de histidinas en lugares adecuados de la superficie de la enzima, permitiendo así una correcta inmovilización de las moléculas de hidrogenasa con respecto al electrodo.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención del electrodo biológico de la invención con el electrodo conductor de material de carbón, en adelante procedimiento de obtención de un electrodo de carbón de la invención, basado en las siguientes etapas:

- a) modificación del electrodo de carbón por electroreducción de un arilderivado de sales de diazonio en medio aprótico o en medio acuoso ácido, que genera grupos amino primarios,
- b) unión covalente de las moléculas de hidrogenasa en tampón fosfato entre 0.01 y 1.0 M, pH entre 5.0 y 9.0, a través de sus grupos carboxilos activados con N-hidroxisuccinimida en presencia de etilcarbodiimida soluble durante un periodo adecuado, y
- c) lavado posterior del electrodo con tampón fosfato.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención de un electrodo de carbón de la invención donde el arilderivado de sales de diazonio del punto a) pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención al siguiente grupo: sal de nitrobenzildiazonio y el 2,5-dimetoxi-4-([4-nitrofenil]azo) bencenodiazonio.

Una realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de obtención de la invención en el que el paso de unión covalente de b) se realiza en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.0 en presencia de N-hidroxisuccinimida 1 mM y etilcarbodiimida 2 mM, durante 90 minutos de incubación.

Otra realización particular de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del electrodo de carbón donde el electrodo es un electrodo de carbón pirolítico "edge" modificado previamente con el reactivo tetrafluoroborato 4-nitrobenzeno diazonio (según el método descrito por P. Allonge y colaboradores en Journal of the American Chemical Society, 119, 201-207, 1997) que se pone en contacto con una disolución 27 μ M de hidrogenasa purificada de *Desulfovibrio gigas* en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.0 en presencia de N-hidroxisuccinimida 1 mM y etilcarbodiimida 2 mM, durante 90 minutos de incubación en esta disolución y lavado posterior del electrodo con tampón fosfato. Este electrodo biológico se activa a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno durante 5 horas.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un segundo procedimiento de obtención del electrodo de carbón de la invención basado en la modificación de superficies de materiales de carbono mediante irradiación con plasma para generar carboxilos que convenientemente modificados con diaminas, por ejemplo en presencia de carbodiimida, y eventualmente N-hidroxisuccinimida dan lugar a recubrimientos con aminas primarias.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención del electrodo biológico de la invención con el electrodo conductor metálico, en adelante procedimiento de obtención de un electrodo metálico de la invención, mediante la modificación del metal, oro por ejemplo, consistente en un recubrimiento con una monocapa de moléculas alquiltioles bifuncionales que llevan en uno de sus extremos grupos tioles con tendencia a la quimisorción y en el otro extremo grupos funcionales que reaccionan con grupos funcionales expuestos en la enzima hidrogenasa para su inmovilización orientada.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del electrodo biológico de la invención, en adelante uso de la invención, en la fabricación de un ánodo de una pila de combustible o de un cátodo de una celda electroquímicas. De forma análoga forman parte de la presente invención una pila de combustible o una celda electrolítica que comprenda el electrodo biológico de la invención.

Descripción detallada

La presente invención se enfrenta al problema de proporcionar nuevos electrodos biológicos para pilas de combustible que sean estables en condiciones de operación.

En la presente invención se describe por primera vez la obtención de un electrodo biológico estable y eficaz mediante la unión covalente de residuos carboxílicos superficiales de la enzima hidrogenasa expuestos de la superficie del enzima con aminas primarias introducidas mediante procedimientos químicos adecuados en la superficie de un electrodo de material metálico o carbonoso que sirve de anclaje de las enzimas. Un resultado sobresaliente de la investigación llevada a cabo, objeto de la presente invención, ha sido el desarrollo de un procedimiento eficaz para la inmovilización orientada de moléculas del enzima hidrogenasa de *Desulfovibrio gigas* sobre la superficie de un electrodo, por ejemplo, de carbón pirolítico que ha sido modificado con compuestos químicos reactivos tales que unen covalentemente las moléculas del enzima, con una orientación tal, que se generan corrientes eléctricas cuando hay hidrógeno en la atmósfera. En ausencia de enzima, o con el electrodo sin modificar, dichas corrientes no se observan.

Además, estos electrodos biológicos también catalizan la producción de hidrógeno, cuando se les aplica un potencial catódico adecuado (Ejemplo 2).

Además, el procedimiento de inmovilización (o anclaje) de las moléculas de hidrogenasa, descrito en la presente invención, permite obtener un electrodo biológico en el que las moléculas del enzima están óptimamente orientadas sobre la superficie del electrodo de manera que pueden catalizar la oxidación de la molécula de hidrógeno, o la reducción de protones, sin necesidad de la incorporación al sistema de mediadores redox, bien solubles o inmovilizados, ya sean monoméricos ó poliméricos. Con este procedimiento las moléculas de hidrogenasa se unen orientadamente a la superficie del electrodo, en función del pH y de la fuerza iónica del medio de la reacción de acoplamiento (Ejemplo 2).

La enzima utilizada presenta motivos de unión con afinidad específicamente por otros motivos generados en la superficie de los electrodos, con la finalidad de que tras la interacción entre ambos motivos, bien sea unión covalente, electrostática, de van der Waals, adopte una orientación preferencial con respecto a la superficie del electrodo que facilite la transferencia de electrones entre ambas entidades, electrodo y enzima; esta orientación preferencial se consolida mediante entrecruzamiento químico a través de los respectivos grupos químicos funcionales enzima-electrodo de manera que el enzima queda firmemente anclada a la superficie del electrodo en una orientación preferencial de sus centros redox que facilita transferencia directa de electrones entre el electrodo soporte y el enzima.

Estos biocatalizadores permiten la generación de corriente eléctrica a partir de hidrógeno y la generación electrolítica de hidrógeno a partir de agua empleando hidrogenasas como catalizador electroquímico también como alternativa al empleo de catalizadores no biológicos. La utilización de estos catalizadores biológicos, capaces de activar la molécula de hidrógeno, en pilas de combustible de hidrógeno podría competir con otros catalizadores comúnmente empleados para oxidar hidrógeno en el ánodo de un pila de combustible, o generar hidrógeno en el cátodo de una celda electroquímica debido al elevado precio de estos metales nobles y/o a su condición de materiales poco abundantes, mientras que las hidrogenasas son inagotables ya que se produce en organismos vivos perpetuables por reproducción biológica. Estos aspectos son importantes porque se espera que el precio de los metales que se utilizan en la actualidad para dichos fines, aumente considerablemente a medida que se extienda la utilización del hidrógeno como combustible limpio. Por el contrario, la producción de hidrogenasas, tanto las comúnmente conocidas como de “Fe-Ni” o las conocidas como de “sólo-Fe”, es un proceso susceptible de mejoras biotecnológicas con el consiguiente abaratamiento de los precios de las enzimas producidas mediante cultivos microbianos o de algas.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un electrodo biológico, en adelante electrodo biológico de la presente invención, basado en la utilización de una enzima tipo hidrogenasa, de Ni-Fe o de tipo “sólo Fe”, como catalizador de oxidación de hidrógeno, unida covalente a un electrodo de un material conductor de electricidad a través de, respectivamente, residuos carboxílicos ó residuos amino expuestos en su superficie ó introducidos mediante procedimientos químicos adecuados en la superficie de dichos electrodos.

El término “enzima tipo hidrogenasa” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a una hidrogenasa del tipo Ni-Fe o del tipo sólo-Fe aisladas de microorganismos - especialmente bacterias, hongos y algas-activadores de hidrógeno, así conocidas por la naturaleza de su centro activo, respectivamente, un agrupamiento de un ión Fe con otro ión Ni o sólo iones de Fe, además de otros elementos no metálicos como azufre, carbono, nitrógeno y oxígeno (“Hydrogen as a fuel: learning from nature”. R. Cammack, M. Fery and R. Robson editors. Taylor and Francis, London and New York, 2001, “Hydrogenases”, Coordination Chemistry Reviews, 249, números 15 y 16, 2005). Además, este término incluye aquellas enzimas o péptidos tipo hidrogenasa obtenidos mediante ingeniería recombinante.

Más concretamente, las enzimas tipo hidrogenasa, tanto las comúnmente conocidas tipo “Fe-Ni”, como tipo “sólo-Fe”, que se pueden utilizar en la presente invención pueden ser aisladas de bacterias activadoras de hidrógeno pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo:

- especies reductoras de azufre, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las del género *Desulfovibrio*,
- especies fijadoras de nitrógeno, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las del género *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azotobacter*, *Gloeocapsa*,
- metanogénicas, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* o *Methanopyrus*,
- fermentativas, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, o *Escherichia*,
- quimiolitotrofas, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Alcaligenes*, *Ralstonia*, y el género *Aquifex hypertermofilico*,
- fotosintéticas entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Pyrococcus*, *Thermococcus* ó

- *Thermotoga*.

Otras enzimas tipo hidrogenasa que se pueden utilizar en la presente invención pueden ser aisladas de algas, tanto procariotas como eucariotas, que metabolizan hidrógeno, pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, a las siguientes especies: *Scenedesmus obliquus*, *Anabaena cilíndrica* y *Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulas*, *Synechocystis* sp PCC 6803, *Nostoc* PCC73102 y *Synechococcus* PCC6301.

Más ampliamente, en el alcance de la presente invención se contempla el uso de hidrogenasas obtenidas a partir de organismos pertenecientes a los siguientes grupos taxonómicos: *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* dentro del dominio *Archea*; *Aquificales*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Thermotogales* dentro del dominio *Bacteria*; *Ciliophora*, *Parabasalidea*, *Chlorophyta* y *Fungi* dentro del dominio *Eukarya*.

Por otro lado, pueden utilizarse una enzima con actividad de hidrogenasa modificada de tal forma que presenta motivos de afinidad localizados en lugares específicos de su superficie que permitan su inmovilización orientada sobre el electrodo conductor convenientemente modificado con motivos complementarios de afinidad y así facilitar la comunicación eléctrica del enzima y el electrodo.

Por lo tanto, un objeto particular de la invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que la enzima hidrogenasa contiene motivos de afinidad localizados en lugares específicos de su superficie que permitan su inmovilización orientada sobre el electrodo conductor. Por ejemplo, determinados complejos metálicos poseen afinidad por agrupamientos de histidinas que pueden introducirse mediante técnicas de ingeniería genética en la hidrogenasa.

Además, estas hidrogenasas pueden ser producidas en especies microbianas nativas o bien a partir de especies modificadas por técnicas de ingeniería genética ó eventualmente producidas en sistemas complejos *in vitro* a partir de secuencias génicas conocidas en el estado del arte o por identificar en el futuro por un técnico experto en el sector de la técnica.

El uso de enzimas con actividad hidrogenasa ya conocidos, o de nuevas hidrogenasas, para el desarrollo del electrodo biológico de la presente invención puede ser llevado a cabo por un técnico experto en la materia con la información descrita en la presente invención.

El término “material conductor” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a materiales conductores de electricidad que pertenecen, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: material metálico (oro, cobre, plata o platino) o material carbonáceo (carbón vítreo, carbón pirolítico “basal”, carbón pirolítico borde (“edge”), hilo de carbón, tela de carbón entre otros tipos de carbón conductor), y sobre cuya superficie pueden introducirse aminos primarias mediante distintas técnicas que permiten el anclaje con las enzimas.

Así, otro objeto particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que el material de electrodo conductor utilizado es un material metálico, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: oro, cobre, plata o platino.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que el material de electrodo utilizado es un material carbonáceo, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: carbón vítreo, carbón pirolítico “basal”, carbón pirolítico borde (“edge”), hilo de carbón y tela de carbón.

Una realización particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que la enzima tipo hidrogenasa es aislada de la bacteria *Desulfovibrio gigas* E.C.1.18.89.1 (la secuencia de aminoácidos del enzima utilizada tiene el código PDB 1H2A de referencia en la base de datos Protein Data Bank) y el electrodo es oro (ver ejemplo 1).

Otra realización particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que la enzima tipo hidrogenasa es aislada de la bacteria *Desulfovibrio gigas* E.C.1.18.89.1 (la secuencia de aminoácidos del enzima utilizada tiene el código PDB 1H2A de referencia en la base de datos Protein Data Bank) y el electrodo es de carbón pirolítico “edge” (ver ejemplo 2).

Otra realización particular de la invención lo representa el electrodo biológico de la invención constituido por un electrodo de material carbonáceo modificado con grupos carboxilos que se modifica además con N,N-bis(carboxymetil)-L-lisina que forman complejos del tipo nitrilotriacético con iones Ni, Cu ó Co (estos complejos metálicos poseen afinidad por agrupamientos de histidinas) y una enzima hidrogenasa modificada o mutada que comprende un motivo de histidinas en lugares adecuados de la superficie de la enzima, permitiendo así una correcta inmovilización de las moléculas de hidrogenasa con respecto al electrodo. Como ejemplo de esta metodología para llevar a cabo este electrodo biológico se cita una realización práctica que se ha llevado a cabo con el enzima ferredoxin-NADP⁺ reductasa - como modelo de enzima - sobre electrodos de oro funcionalizados con complejos metálicos de Cu o Ni con cadenas de nitrilotriacético y pares de histidina introducidas mediante técnicas de ingeniería genética en regiones de la superficie del enzima, seleccionadas para dar lugar, tras su inmovilización en la superficie del electrodo a las orientaciones deseadas y en una orientación óptima tiene actividad catalítica en ausencia de mediadores externos redox (J. Madoz, J.M.

Abad, J. Fernandez-Recio, M. Velez, L. Vazquez, C. Gomez-Moreno, V.M. Fernández. Modulation of electroenzymatic NADPH oxidation through oriented immobilization of ferredoxin:NADP reductase onto modified gold electrodes. *Journal of the American Chemical Society* (2000) 122: 9808-9817).

Por otra parte, el electrodo biológico de la invención puede fabricarse, obtenerse o elaborarse de distintas formas en función del material del electrodo conductor sea metálico o carbón. Así, otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención del electrodo biológico de la invención con el electrodo conductor de material de carbón, en adelante procedimiento de obtención de un electrodo de carbón de la invención, basado en las siguientes etapas:

a) modificación del electrodo de carbón por electroreducción de un arilderivado de sales de diazonio en medio aprótico o en medio acuoso ácido, que genera grupos amino primarios,

b) unión covalente de las moléculas de hidrogenasa en tampón fosfato entre 0.01 y 1.0 M, pH entre 5.0 y 9.0, a través de sus grupos carboxilos activados con N-hidroxisuccinimida en presencia de etilcarbodiimida soluble durante un periodo adecuado, y

c) lavado posterior del electrodo con tampón fosfato.

Posteriormente, este electrodo biológico así obtenido se activa a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno antes de su uso.

La funcionalización de electrodos de carbón con una monocapa de grupos amino, o de grupos carboxilos se puede llevar a cabo por métodos descrito por Saveant y colaboradores mediante la reducción electroquímica de sales de aril diazonio adecuadas (Delamar, M., Hitmi, R., Pinson, J., Saveant, J.M., *J. Am. Chem. Soc.* 119, 201-207, 1992; Allongue, P.; Delamar, M.; Desbat, B.; Fagebaume, O.; Hitmi, R.; Pinson, J.; Saveant, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 201-207).

Asimismo, la funcionalización de la superficie de electrodos de carbón con grupos carboxilos, puede llevarse a cabo por otros métodos químicos. A título de ejemplo, mediante tratamiento de superficies de carbón con plasma de oxígeno (J.I. Paredes, A. Martínez-Alonso and J.M.D. Tascón, *J. Colloid Interf. Science* 258, 276-282, 2003) ó mediante oxidación directa con ácido nítrico ó peróxido de hidrógeno (Detection of specific electronic interactions at the interface aromatic hydrocarbon-graphite by immersion calorimetry. B. Bachiller-Baeza, A. Guerrero-Ruiz and I. Rodríguez-Ramos. *Studies on Surface Science and Catalysis*, en prensa) ó por tratamiento combinado químico y electroquímico consistente en la oxidación electroquímica en presencia de dicromato potásico (J. Bianco, J. Haladjian and C. Bourdillon. *J. Electroanalytical Chemistry*, 293, 151-163 (1990).

Además, partiendo de estos electrodos funcionalizados con grupos carboxilos es posible una modificación química con diaminas (por ejemplo etilenediamina) para generar grupos aminos libres terminales en unión covalente con la superficie de carbón del electrodo.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención de un electrodo de carbón de la invención donde el arilderivado de sales de diazonio del punto a) pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención al siguiente grupo: sal de nitrobenzildiazonio y el 2,5-dimetoxi-4-([4-nitrofenil]azo) bencenodiazonio.

En esta invención es clave el valor del pH (en un rango entre 5.0 y 9.0) y de la fuerza iónica (correspondiente a un rango de molaridad de tampón fosfato entre 0.01 y 1.0 M) existentes durante la inmovilización covalente del enzima, para orientarla adecuadamente y permitir la transferencia directa de electrones al electrodo, habiéndose establecido unas condiciones preferentes (ver ejemplo 2). Así, una realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de obtención de la invención en el que el paso de unión covalente de b) se realiza en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.0 en presencia de N-hidroxisuccinimida 1 mM y etilcarbodiimida 2 mM, durante 90 minutos de incubación.

Otra realización particular de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del electrodo de carbón donde el electrodo es un electrodo de carbón pirolítico "edge" modificado previamente con el reactivo tetrafluoroborato 4-nitrobenzeno diazonio (según el método descrito por P. Allongue y colaboradores en *Journal of the American Chemical Society*, 119, 201-207, 1997) que se pone en contacto con una disolución 27 μ M de hidrogenasa purificada de *Desulfovibrio gigas* en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.0 en presencia de N-hidroxisuccinimida 1 mM y etilcarbodiimida 2 mM, durante 90 minutos de incubación en esta disolución y lavado posterior del electrodo con tampón fosfato. Este electrodo biológico se activa a temperatura ambiente en atmósfera de hidrógeno durante 5 horas.

Otro objeto particular de la presente invención lo constituye un segundo procedimiento de obtención del electrodo de carbón de la invención basado en la modificación de superficies de materiales de carbono mediante irradiación con plasma para generar carboxilos que convenientemente modificados con diaminas, por ejemplo en presencia de carbodiimida, y eventualmente N-hidroxisuccinimida dan lugar a recubrimientos con aminas primarias.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de obtención del electrodo biológico de la invención con el electrodo conductor metálico, en adelante procedimiento de obtención de un electrodo metálico de la

invención, mediante la modificación del metal, oro, cobre, plata, platino por ejemplo, consistente en un recubrimiento con una monocapa de moléculas alquiltioles bifuncionales que llevan en uno de sus extremos grupos tioles con tendencia a la quimisorción y en el otro extremo grupos funcionales que reaccionan con grupos funcionales expuestos en la enzima hidrogenasa para su inmovilización orientada (J. Madoz, B. Kuznetsov, J.L. Garcia, J. Medrano and V.M. Fernandez. Functionalization of gold surfaces for specific and oriented attachment of a fused b-Galactosidase and choline- receptor protein; Journal of the American Chemical Society (1997) 119: 1043- 1051; J. Madoz, J.M. Abad, J. Fernández-Recio, M. Velez, L. Vazquez, C. Gómez-Moreno & V.M. Fernández. Modulation of electroenzymatic NADPH oxidation through oriented immobilization of Ferredoxin:NADP⁺ reductase onto modified gold electrodes. Journal of the American Chemical Society (2000) 122: 9808- 9817; ver ejemplo 1)).

Los electrodos biológicos de la invención utilizados como ánodos permiten obtener energía eléctrica del hidrógeno en una configuración típica de pilas de combustible; asimismo, con estos electrodos biológicos como cátodos es posible producir hidrógeno a partir de agua en una configuración típica de célula electroquímica.

Así, otro objeto de la presente invención lo constituye el uso del electrodo biológico de la invención, en adelante uso de la invención, en la fabricación de un ánodo de una pila de combustible o de un cátodo de una celda electroquímicas. De forma análoga forman parte de la presente invención una pila de combustible o una celda electrolítica que comprenda el electrodo biológico de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. *Voltamograma cíclico obtenido con un electrodo metálico de oro*. Este electrodo que presenta una superficie electroquímica de 0.18 cm². La curva inferior corresponde a una medida llevada a cabo bajo nitrógeno (curva continua) y la superior corresponde al mismo electrodo tras 5 horas de incubación en atmósfera de hidrógeno (línea rayada).

Figura 2.- *Voltamograma cíclico de un electrodo de carbón pirolítico unido a una enzima hidrogenasa*. El trazo continuo corresponde a un electrodo control mantenido 30 minutos horas bajo nitrógeno antes del experimento electroquímico y el trazo discontinuo corresponde a un electrodo similar tras haber activado el enzima hidrogenasa durante cinco horas bajo hidrógeno.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1

Electrodo biológico sobre electrodo metálico de oro

Una realización particular de la presente invención lo constituye el electrodo biológico de la invención en el que la enzima tipo hidrogenasa es aislada de la bacteria *Desulfovibrio gigas*, E.C.1.18.89.1 (Secuencia de aa del enzima utilizada o referencia de la base de datos en el Protein Data Bank tiene el código PDB 1H2A) y el electrodo es oro policristalino en forma de hilo, pulido y lavado como se describe en Fernández V.M. y colaboradores, (Journal of the American Chemical Society, 119, 1043-1051, 1997) que se sonica durante 15 minutos en etanol. A continuación se incuba en 1 mM cistamina en etanol:agua 2:1 durante 20 horas; tras lavado con tampón Hepes 10 mM pH 7.6, se sumerge en una disolución 0.8 micromolar de hidrogenasa de *D. gigas* conteniendo N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-etilcarbodiimida hidroclorehidrato y N-hydroxy succinimida 10 mM en tampón Hepes, pH 7.6 durante 90 min a 25°C.

A continuación se coloca en una celda electroquímica típica de tres electrodos, el de referencia es uno de Ag/ClAg, el contraelectrodo es uno de platino y el de trabajo es el electrodo de oro modificado con la hidrogenasa. Se llevaron a cabo voltamogramas cíclicos con un potenciostato Autolab 30 bajo atmósfera controlada a 25°C.

La Figura 1 muestra voltamogramas cíclicos obtenidos con este electrodo que presenta una superficie electroquímica de 0.18 cm². Las medidas fueron hechas en tampón fosfato 100 mM, pH 8.0 a una velocidad de barrido de 20 mV/s a temperatura de 25°C. La curva inferior corresponde a una medida llevada a cabo bajo nitrógeno (curva continua) y la superior corresponde al mismo electrodo tras 5 horas de incubación en atmósfera de hidrógeno (línea rayada).

Estos electrodos biológicos de oro han sido funcionales tanto para la producción de hidrógeno (a partir de protones y electrones suministrados por el electrodo) como para la oxidación de hidrógeno presente en la disolución con la producción concomitante de una corriente eléctrica, aunque la estabilidad obtenida en esta realización concreta es menor que la observada en el ejemplo siguiente.

Ejemplo 2

Electrodo biológico en un electrodo de carbón pirolítico

Se ha investigado en la preparación de electrodos funcionales de hidrogenasas utilizando como electrodos materiales carbonáceos, tales como carbón vítreo ó carbón pirolítico. Estos electrodos convenientemente modificados mediante tratamientos químicos, han permitido la unión covalente y duradera de las moléculas de hidrogenasa ais-

ladas de la bacteria *Desulfovibrio gigas* purificada según el método de E.C. Hatchikian y cols. (Characterization of the periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. E.C. Hatchikian, M. Brushi and J. leGall, Biochemical and Biophysical Research Communications 82, 451-461(1978)).

En este ejemplo se crea una capa superficial de aminas primarias en electrodos de carbón pirolítico obtenidos de Pine Instruments, Inc. (USA) mediante reducción electroquímica de sales de diazonio; en el ejemplo descrito, se hace reaccionar un electrodo de carbón pirolítico "edge" (modificado previamente con el reactivo tetrafluoborato 4-nitrobenceno diazonio según el método descrito por P. Allonge y colaboradores en Journal of the American Chemical Society, 119, 201-207, 1997), con una disolución 27 μ M de hidrogenasa purificada de *Desulfovibrio gigas* en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.0 en presencia de N-hidroxisuccinimida 1 mM y etilcarbodiimida 2 mM. Tras 90 minutos de incubación en esta disolución el electrodo se lava con tampón fosfato y a continuación se coloca en una celda electroquímica típica de tres electrodos, uno de Ag/ClAg como referencia, otro de platino como contra electrodo, y el electrodo de carbón pirolítico modificado con la hidrogenasa como electrodo de trabajo. Se llevaron a cabo voltamogramas cíclicos con un potencióstato Autolab 30 bajo atmósfera controlada a 25°C.

La Figura 2 presenta voltamogramas cíclicos de oxidación catalítica de hidrógeno con los electrodos de grafito pirolítico modificados covalentemente con hidrogenasas según el procedimiento más arriba detallado. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C, en tampón fosfato 100 mM, pH 8.0 a una velocidad de barrido de 20 mV/s. El trazo continuo corresponde a un electrodo control mantenido 30 minutos horas bajo atmósfera de nitrógeno antes del experimento electroquímico. La línea punteada corresponde a un voltamograma cíclico obtenido con el electrodo de hidrogenasa tras haber activado el enzima hidrogenasa durante cinco horas bajo hidrógeno; el voltamograma cíclico correspondiente al enzima activado (trazo punteado), muestra claramente la actividad catalítica de este electrodo, que es persistente incluso tras una semana de trabajo en condiciones operativas (Figura 2).

Es importante destacar que en ninguno de estos experimentos se ha añadido mediador redox. Los resultados son concluyentes de la existencia de importantes corrientes de oxidación de hidrógeno catalizada por el enzima hidrogenasa en una orientación óptima para comunicarse electrónicamente con la superficie del electrodo. Bajo las mismas condiciones, electrodos en los que el enzima no se unió mediante enlace covalente no dieron lugar a corriente detectable alguna, ni siquiera en presencia de mediadores redox. Electrodos preparados similarmente a valores de fuerza iónica alta no dieron lugar a corrientes medibles.

Se compararon las corrientes medidas en presencia y en ausencia de mediadores con electrodos preparados similarmente al del ejemplo pero a diferentes fuerzas iónicas. Los resultados que se presentan a continuación indican que la actividad aumenta cuando la fuerza iónica disminuye.

TABLA 1

Relación entre las corrientes catalíticas directa frente a la mediada con metilviológeno como mediador observadas con electrodos modificados con hidrogenasa a diferentes fuerzas iónicas

Fuerza iónica	0.02	0.31	0.60	1.0
$I_{cat} \text{ (dir)} / I_{cat} \text{ (med)}^a$	0.70	0.47	0.15	0.06

^{a)} La corriente catalítica se midió a 0 V a partir de voltamogramas cíclicos similares a los de la Figura 2 tras sustraer las corrientes medidas bajo nitrógeno, antes de activar el electrodo con hidrógeno durante 5 horas.

Con estos electrodos se ha medido en continuo la corriente generada en atmósfera de H₂ a temperatura ambiente en el laboratorio con un potencial aplicado a -0.4 V frente a un electrodo de referencia de Ag/ClAg, obteniéndose más de un 90% de estabilidad tras dos semanas de operación ininterrumpida.

En esta invención es importante el valor del pH (en un rango entre 5.0 y 9.0) y de la fuerza iónica (correspondiente a un rango de molaridad de tampón fosfato entre 0.01 y 1.0 M) existentes durante la inmovilización covalente del enzima, para orientarla adecuadamente y permitir la transferencia directa de electrones al electrodo lo que proporciona una gran estabilidad del electrocatalizador en las condiciones de operación. La estabilidad se ha medido en continuo, a potencial fijo bajo corriente de hidrógeno a temperatura de 25° observándose que, tras más de dos semanas en continuo, una actividad incluso superior a la inicial, probablemente debido a una mayor activación de moléculas de enzima (datos no mostrados).

El fundamento racional del método de inmovilización de la hidrogenasa de Fe-Ni del que la enzima de *Desulfovibrio gigas* puede considerarse como estructura tipo de estas hidrogenasas, objeto de la presente invención, es la existencia de un fuerte momento dipolar en la molécula de dicho enzima como consecuencia de una distribución asimétrica de residuos de aminoácidos cargados en la superficie del enzima. En particular el cluster redox distal de la proteína (un agrupamiento [4Fe-4S] a través del cual el enzima transfiere los electrones obtenidos de la oxidación de

ES 2 322 880 B1

la molécula de hidrógeno) está rodeado por una corona de residuos glutámicos. Este dipolo permanente en la molécula de hidrogenasa resulta ser esencial para una correcta transferencia de los electrones a la molécula de citocromo c_3 el aceptor fisiológico de este tipo de hidrogenasas, que presenta un agrupamiento de lisinas que, con sus cargas positivas, complementan las cargas de los glutámicos, facilitando una correcta orientación de ambas proteínas y una transferencia óptima de electrones entre las mismas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Electrodo biológico **caracterizado** porque contiene una enzima tipo hidrogenasa, de Ni-Fe o de tipo “sólo Fe”, como catalizador de oxidación de hidrógeno, unida covalente a un electrodo de un material conductor de electricidad a través de, respectivamente, residuos carboxílicos ó residuos amino expuestos en su superficie ó introducidos en la superficie de dicho electrodo.

2. Electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la enzima tipo hidrogenasa es una hidrogenasa aislada de microorganismos activadores de hidrógeno u obtenida mediante ingeniería genética recombinante.

3. Electrodo biológico según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la enzima tipo hidrogenasa es aislada de bacterias activadoras de hidrógeno pertenecientes al siguiente grupo:

- especies reductoras de azufre, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las del género *Desulfovibrio*,
- especies fijadoras de nitrógeno, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las del género *Rhizobium*, *Gloeocapsa*,
- metanogénicas, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina* o *Methanopyrus*,
- fermentativas, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, o *Escherichia*,
- quimiolitotrofas, entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Alcaligenes*, *Ralstonia*, y el género *Aquifex* hipertermofílico,
- fotosintéticas entre las que se incluyen, aunque no exclusivamente, las de los géneros *Chromatium* ó *Rhodobacter* ó *Thiocapsa*) hipertermofílicas (entre las que se incluye, aunque no exclusivamente las de los géneros *Pyrococcus* o *Thermococcus* ó *Thermotoga*).

4. Electrodo biológico según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la enzima tipo hidrogenasa es aislada de algas, tanto procariotas como eucariotas, que metabolizan hidrógeno, pertenecientes a las siguientes especies: *Scenedesmus obliquus*, *Anabaena cilíndrica* y *Anabaena variabilis*, *Anacystis nidulas*, *Synechocystis* sp PCC 6803, *Nostoc* PCC73102 y *Synechococcus* PCC6301.

5. Electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la enzima tipo hidrogenasa es una enzima con actividad de hidrogenasa modificada con motivos de afinidad localizados en lugares específicos de su superficie que permiten su inmovilización orientada sobre el electrodo conductor convenientemente modificado con motivos complementarios de afinidad.

6. Electrodo biológico según la reivindicación 5 **caracterizado** porque la modificación consiste en un agrupamiento de histidinas.

7. Electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el electrodo de material conductor pertenece al siguiente grupo: material metálico o material carbonáceo.

8. Electrodo biológico según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el material metálico pertenece al siguiente grupo: oro, cobre, plata o platino.

9. Electrodo biológico según la reivindicación 7 **caracterizado** porque el material carbonáceo pertenece al siguiente grupo: carbón vítreo, carbón pirolítico “basal”, carbón pirolítico borde (“edge”), hilo de carbón, tela de carbón, carbón microporoso, tamices moleculares carbonosos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono.

10. Electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la enzima tipo hidrogenasa es la enzima aislada de la bacteria *Desulfovibrio gigas* E.C.1.18.89.1 (la secuencia de aminoácidos del enzima utilizada tiene el código PDB 1H2A de referencia en la base de datos Protein Data Bank) y el electrodo conductor es de oro.

11. Electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la enzima tipo hidrogenasa es la enzima aislada de la bacteria *Desulfovibrio gigas* E.C.1.18.89.1 (la secuencia de aminoácidos del enzima utilizada tiene el código PDB 1H2A de referencia en la base de datos Protein Data Bank) y el electrodo conductor es de carbón pirolítico “edge”.

12. Electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque está constituido por un electrodo de material carbonáceo modificado con grupos carboxilos que se modifica además con N,N-bis(carboximetil)-L-lisina que forman complejos del tipo nitrilotriacético con iones Ni, Cu ó Co (estos complejos metálicos poseen afinidad por

ES 2 322 880 B1

agrupamientos de histidinas) y una enzima hidrogenasa modificada o mutada que comprende un motivo de histidinas en lugares adecuados de la superficie de la enzima.

13. Procedimiento de obtención del electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el electrodo conductor es de material carbonáceo y porque comprende las siguientes etapas:

a) modificación del electrodo de carbón por electroreducción de un arilderivado de sales de diazonio en medio aprótico o en medio acuoso ácido, que genera grupos amino primarios,

b) unión covalente de las moléculas de hidrogenasa en tampón fosfato entre 0.01 y 1.0 M, pH entre 5.0 y 9.0, a través de sus grupos carboxilos activados con N-hidroxisuccinimida en presencia de etilcarbodiimida soluble durante un periodo adecuado, y

c) lavado posterior del electrodo con tampón fosfato.

14. Procedimiento de obtención del electrodo biológico según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el arilderivado de sales de diazonio del punto a) pertenece al siguiente grupo: sal de nitrobenzildiazonio y el 2,5-dimetoxi-4-([4-nitrofenil]azo)bencenodiazonio.

15. Procedimiento de obtención del electrodo biológico según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el paso de unión covalente se realiza en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.0 en presencia de N-hidroxisuccinimida 1 mM y etilcarbodiimida 2 mM, durante 90 minutos de incubación.

16. Procedimiento de obtención del electrodo biológico según la reivindicación 13 **caracterizado** porque el electrodo conductor es un electrodo de carbón pirolítico "edge" modificado previamente con el reactivo tetrafluoroborato 4-nitrobenzeno diazonio que se pone en contacto con una disolución 27 μ M de hidrogenasa purificada de *Desulfovibrio gigas* en tampón fosfato 0.01 M, pH 6.0 en presencia de N-hidroxisuccinimida 1 mM y etilcarbodiimida 2 mM, durante 90 minutos de incubación en esta disolución y lavado posterior del electrodo con tampón fosfato.

17. Procedimiento de obtención del electrodo biológico según la reivindicación 13 **caracterizado** porque la modificación de la superficie del electrodo de carbón de a) en concreto de material carbonáceo se lleva a cabo mediante irradiación con plasma para generar carboxilos que convenientemente modificados con diaminas, en presencia de carbodiimida, y eventualmente N-hidroxisuccinimida recubren el electrodo de aminas primarias.

18. Procedimiento de obtención del electrodo biológico según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el electrodo conductor es metálico y porque la modificación del electrodo metálico se lleva a cabo mediante un recubrimiento con una monocapa de moléculas alquiltioles bifuncionales que llevan en uno de sus extremos grupos tioles con tendencia a la quimisorción y en el otro extremo grupos funcionales que reaccionan con grupos funcionales expuestos en la enzima hidrogenasa para su inmovilización orientada.

19. Procedimiento de obtención del electrodo biológico según la reivindicación 18 **caracterizado** porque el electrodo metálico es de oro.

20. Uso del electrodo biológico según las reivindicaciones 1 a la 12 en la fabricación de un ánodo de una pila de combustible o de un cátodo de una celda electroquímicas.

21. Pila de combustible **caracterizada** porque comprende un electrodo biológico según las reivindicaciones 1 a la 12.

22. Celda electrolítica **caracterizada** porque comprende un electrodo biológico según las reivindicaciones 1 a la 12.

Figura 1

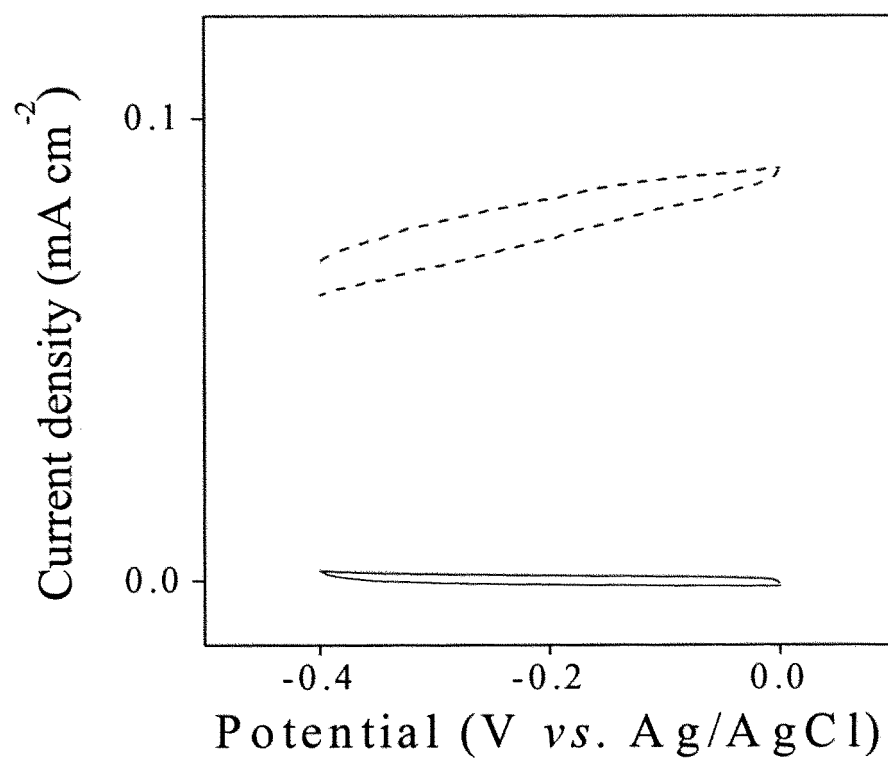
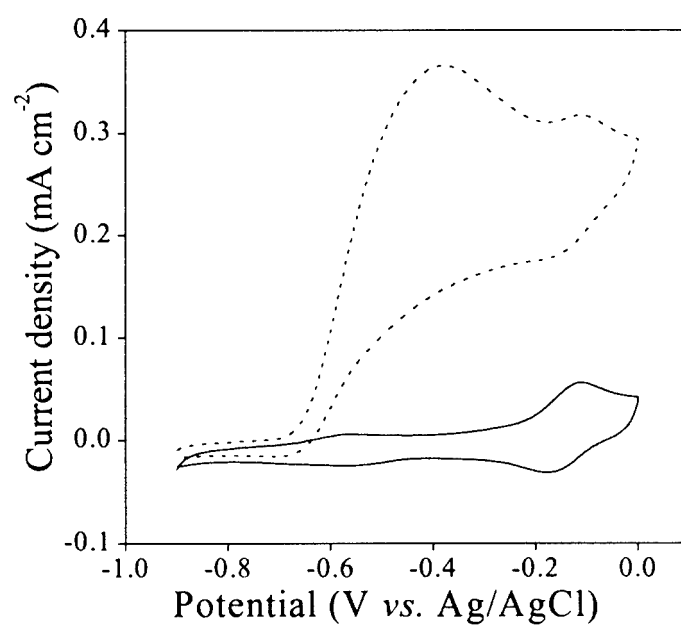


Figura 2





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 322 880

⑫ Nº de solicitud: 200502386

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 30.09.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	(MADOZ-GÚRPIDE, J., et al) Modulation of electroenzymatic NADPH oxidation through oriented immobilization of ferredoxin: NADP+ reductase onto modified gold electrodes. J Am Chem Soc. 2000. Vol. 122 nº 40, páginas 9808-9817.	1-3,5-8, 18-22
Y	(ZHANG, S. et al) Covalent attachment of glucose oxidase to and Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor. Bioelectrochemistry. Sept 2005. Accesible on line el 17.02.2005. Vol. 67 (1), páginas 15-22.	1-3,5-8, 18-22
A	WO 2004114494 A2 (THE CHEMISTRY FACULTY OF THE MOSCOW STATE UNIVERSITY) 29.12.2004, todo el documento.	1-22
A	GB 2391945 A (E2V TECHNOLOGIES LIKITED) 18.02.2004, todo el documento.	1-22

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.06.2009

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

H01M 4/88 (2006.01)

H01M 8/16 (2006.01)

C12N 11/14 (2006.01)